

SÔBRE A PROVÁVEL OCORRÊNCIA DE BORRACHA NO
CLORÊNQUIMA DE *RAUVOLFIA GRANDIFLORA* MART.
(*APOCYNACEAE*)

CECÍLIA R. GONÇALVES *

Procedendo ao estudo anatômico da fôlha de uma apocinácea, *Rauvolfia grandiflora* Mart., tivemos a nossa atenção atraída para a ocorrência em seu mesofilo, de numerosos glóbulos de aspecto peculiar (fotos n.º 1 e 2).

Julgando que se tratasse de gotas lipídicas, submetemos cortes do material aos testes de solubilidade e de coloração usuais. Verificamos que, embora coráveis pelo Sudan IV e solúveis no éter e no clorofórmio, eram insaponificáveis e insolúveis na acetona.

Com base na bibliografia consultada (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7), (8), resolvemos orientar nossas pesquisas no sentido de constatar a existência de borracha na constituição desses glóbulos, procurando adotar as diretrizes traçadas pelos autores citados.

Até alguns anos atrás, só se admitia a ocorrência de borracha nos vegetais, sob duas formas (8): no látex ou nas células dos canais resiníferos cujos protótipos eram *Hevea* e *Taraxacum* para a primeira e *Parthenium* para a segunda. A possível ocorrência de borracha em outras regiões, assim como uma provável relação entre a sua formação e a atividade dos clo-roplastas, tem sido estudada recentemente (8).

Alguns pesquisadores (3), (8) verificaram que nem tóda a borracha obtida a partir das fôlhas de *Chrysothamnus* e *Cryptostegia*, e outros vegetais era proveniente do látex. Após acuradas pesquisas concluíram que determinadas formações ocorrentes no mesofilo dessas plantas, eram constituídas por um complexo de substâncias, entre as quais predominava a borracha.

KHITTENEERGER-KELNER no trabalho já assinalado (8), sôbre fôlhas de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e de um híbrido (*C. madagascariensis* Boj. e *C. grandiflora* R. Br.), constataram a ocorrência de borracha em glóbulos que observaram no clorênquima dessas fôlhas. Para confirmar essa descoberta, ao lado dos testes de solubilidade e de coloração, procederam à extração e caracterização da borracha.

* Bolsista da Associação Brasileira de Mulheres Universitárias.

MATERIAL E MÉTODOS

As observações foram feitas em folhas de exemplares de *Rauwolfia grandiflora* Mart. cultivados no Jardim Botânico do Rio de Janeiro, provenientes de Rocinha, (Gávea), *Estado da Guanabara*.

Os cortes de material fresco, feitos com auxílio do micrótomo de Ranvier e da navalha histológica, foram corados pelo Sudan III (segundo fórmula de Stevens) (7) e IV (solução saturada em álcool a 80°). Como meios de montagem, usamos a mistura glicerina-água (partes iguais) e o Karo.

ASPECTO, DISTRIBUIÇÃO E PROPRIEDADES DOS GLÓBULOS

Observados ao microscópio antes de qualquer tratamento, apresentam-se com o aspecto de massas globulares incolores, homogêneas, hialinas e refringentes. Esta feição é mantida após o uso do hipoclorito o qual tem a propriedade de por um evidência os glóbulos menores que estavam anteriormente um tanto ocultos pelos cloroplastas. Segundo Whittenberger-Kelner (8), o hipoclorito ao destruir os cloroplastas, põe em liberdade os glóbulos que provavelmente se encontravam no interior dos mesmos.

Ocorrem em todo o mesofilo, sendo geralmente maiores e mais numerosos nas células paliádicas, (fotos n.º. 1 e 2) onde, via de regra, há de 3-5 em cada, sendo 1 ou 2 de maior diâmetro (13 *micra* em média). Os autores acima referidos (8) dizem a respeito da ocorrência de glóbulos semelhantes, no parênquima lacunoso de *Cryptostegia grandiflora* R. Br.: "In the dorsal half of the leaf (spongy parenchyma), the globule-bearing cells are more numerous adjoining the ducts than in nonduct areas." Não observamos tal fato em *Rauwolfia grandiflora* Mart.

Antes de empregarmos a coloração pelo Sudan IV, dividimos os cortes em dois grupos:

- a — Com tratamento prévio pelo hipoclorito;
- b — Sem tratamento prévio.

De cada grupo, retiramos alguns cortes que foram submetidos à extração pela acetona, enquanto outros não sofreram este tratamento. Em todos os casos, os glóbulos coraram-se intensamente de vermelho, após a ação do Sudan IV durante 20 minutos. Em linhas gerais, seguimos a técnica abaixo:

- 1 — Clareamento pelo hipoclorito (mais ou menos 5 minutos);
- 2 — Lavagem em água;
- 3 — Tratamento pelo álcool a 50° e a 80° (rapidamente);
- 4 — Extração pela acetona (de 24 a 48 horas);
- 5 — Coloração pelo Sudan IV (20 minutos);
- 6 — Tratamento pelo álcool a 80° e 50° (rapidamente);
- 7 — Montagem em glicerina-água (partes iguais).

Naturalmente para os cortes que não sofreram a ação da acetona, suprimimos o item 4.

Antes de submetermos os cortes aos testes de solubilidade, usamos o clareamento pelo hipoclorito e, quando necessário, em face da natureza do solvente empregado, desidratamos o material. Este permaneceu em cada solvente pelo espaço de 48 horas, após o que foi montado e observado ao microscópio. Apenas o teste de saponificação pelo reagente de Molisch foi feito em breve espaço de tempo e o tratamento pelo hipoclorito, por motivos óbvios, foi rápido. Damos abaixo o resultado das nossas observações:

I — Os glóbulos mostraram-se solúveis no éter, clorofórmio, benzeno, xilol e tetracloreto de carbono;

II — Insolúveis no hipoclorito, água fervente, ácido sulfúrico a 5%, álcool absoluto, metanol, acetona e bissulfeto de carbono;

III — Insaponificáveis quando tratados pelo reagente de Molisch e por uma solução de hidróxido de potássio a 10% em álcool 95°. Na tabela anexa, mostramos o comportamento dos glóbulos em face a cada um dos reagentes empregados.

TABELA

REAGENTES	AÇÃO SOBRE OS GLÓBULOS:
Acetona	Insolúveis, algo deformados e dilatados, com finas pontuações
Ácido acético	Insolúveis, ligeiramente deformados e pontuados
Ácido sulfúrico 5% ...	Insolúveis e pontuados
Ácido sulfúrico 72% ..	Material não resistiu ao tratamento
Álcool absoluto	Insolúveis, levemente dilatados
Benzeno	Solúveis
Bissulfeto de carbono .	Idem
Clorofórmio	Solúveis, deixando resíduo insignificante prêso às paredes celulares
Éter	Solúveis
Hipoclorito	Insolúveis e inalteráveis quando o tratamento é rápido; o tratamento prolongado, deforma-os
Metanol	Insolúveis com finas pontuações
Tetracloreto de carbono	Solúveis
Xilol	Idem
Reagente de Molisch .	Insolúveis e insaponificáveis; ligeiramente dilatados
Hidróxido de potássio em álcool a 95% ...	Insolúveis, insaponificáveis, bastante contraídos
Água fervente	Insolúveis

Prosseguindo as nossas observações, submetemos o material à ação dos vapores de bromo que tem a propriedade de formar compostos de adição com várias substâncias, sem atacar porém, a borracha (4). Observamos que os glóbulos maiores tomaram coloração alaranjada clara, tornaram-se finamente pontuados e bastante dilatados. Notamos ainda, o aparecimento de zonas concêntricas de densidades diferentes, sendo a periférica mais flúida e permanecendo a central, quasi inalterada. Os glóbulos menores coraram-se de alaranjado forte e permaneceram homogêneos, embora finamente pontuados.

HALL-GOODSPEED (4) chamam a atenção para o fato de que a borracha ocorrente no citoplasma celular, pode ser confundida com acumulações de óleos e resinas. Dizem ainda que, por falta de um corante específico para borracha, quando associada àquelas substâncias, os empregados usualmente podem trazer confusão, porque coram também êsses corpos. Recomendam por isso, o uso da acetona como solvente, antes de utilizar o corante, para evitar essas causas de êrro. Reproduzimos a técnica recomendada por êles, que transcrevemos abaixo. Usamos o mesmo corante (Sudan III, segundo fórmula de STEVENS) (7) e constatamos que os glóbulos permaneceram e tomaram o corante.

- 1 — Tratar os cortes por álcool 95° — 5 minutos;
- 2 — Pô-los em ebulção num tubo de ensaio contendo acetona e aquecê-los em banho-maria a 60°C — 15 a 30 minutos;
- 3 — Corá-los pelo Sudan III (segundo fórmula de STEVENS) — 18 horas;
- 4 — Lavar o excesso de corante em álcool 50°;
- 5 — Montar em glicerina.

WHITTENBERGER-KELNER (8) citando SPENCE e CALDWELL (6), referem-se ao fato de que algumas gorduras tornam-se insolúveis na acetona, quando associadas a proteínas. Para eliminar êsse inconveniente, recomendam a hidrólise e remoção das proteínas antes da extração pela acetona, de acôrdo com a técnica seguinte:

- 1 — Extrair em água a 25°C, por 16 horas e mais 8 horas em ebulção;
- 2 — Extrair em ácido sulfúrico a 5% a 25°C, por 16 horas e mais 8 horas em ebulção;
- 3 — Repetir o item I;
- 4 — Extrair em acetona, a 25°C por 32 horas e mais 16 horas em ebulção;
- 5 — Corar os cortes e depois submetê-los à extração pelo benzeno, conforme item IV.

Tentamos reproduzir esta técnica com os cortes de *Rauwolfia grandiflora* Mart., porém o material não resistiu ao tratamento pelo ácido sulfúrico em ebulção. Entretanto, pudemos verificar que os glóbulos permaneceram após o tratamento pelo ácido sulfúrico à frio.

Seguindo técnica de BONNER-ARREGUIN (1), tentamos a extração da borracha e sua caracterização por turbidez. Para isso, submetemos o material depois de sêco e finamente pulverizado, à extração pela acetona (para retirar tôdas as substâncias nela solúveis, como resinas e gorduras). Depois de centrifugado, tratamos pelo benzeno, com o fim de remover a borracha e após nova centrifugação, o extrato benzênico foi recebido em metanol. A turvação que se formou com subsequente precipitação, parece-nos demonstrar a ocorrência de borracha no extrato benzênico. Para evitar qualquer confusão com a borracha que pudesse existir no látex, deixámo-lo exsudar ao coletar o material e fizemos ainda, a remoção das nervuras, tendo em vista que o sistema laticífero acompanha, via de regra, os feixes vasculares.

Pretendíamos extrair maior quantidade da substância para proceder ao exame de seu espectro, aos raios infra-vermelhos. Por carência de material, resolvemos aguardar a produção de novas fôlhas. Entretanto, verificamos a ausência quase total dos glóbulos (cuja possível causa explicaremos mais adiante), o que nos impediu de realizar êsse teste definitivo, antes da publicação do presente trabalho. É nosso intuito, realizá-lo na época em que pelas observações feitas por nós, as fôlhas de *Rauwolfia grandiflora* Mart. produzem maior quantidade de glóbulos.

Iniciamos nossas observações no mês de outubro de 1960 e constatamos que houve maior produção de glóbulos (em tamanho e quantidade), no período compreendido entre janeiro e julho do ano em curso. Durante os meses de agôsto, setembro e outubro, essas formações diminuíram sensivelmente, a ponto de observarmos apenas raros e pequenos glóbulos no interior de algumas células. Podemos verificar a exatidão desta assertiva, comparando as fotos de números 2 e 3.

RESUMO E CONCLUSÕES

Observamos a ocorrência de glóbulos no mesófilo de *Rauwolfia grandiflora* Mart. que, por seu aspecto e propriedades nos pareceram semelhantes a outros referidos por Whittenger-Kelner (8) nas fôlhas de *Cryptostegia grandiflora* R. Br. e de um híbrido.

Verificamos que tais glóbulos, não só por seu aspecto como pelo fato de serem coráveis pelo Sudan IV, podiam ser confundidos com substâncias outras tais como resinas, gorduras, e mucilagens.

No entanto, os testes microquímicos revelaram-nos que êsses glóbulos eram insolúveis na acetona, considerada não solvente "polar" da borracha, embora exerça sobre ela uma leve ação dilatadora (2). Verificamos igualmente que êsses glóbulos eram insolúveis nos demais solventes comuns das resinas: etanol, ácido sulfúrico e cloral hidratado, o que afasta qualquer hipótese de serem constituídos por aquelas substâncias. Também não podem ser confundidos com mucilagens e gomas por serem insolúveis na água fervente, cloral hidratado, hipoclorito e solúveis no éter.

Além da ação muito característica da acetona, o que afasta igualmente a possibilidade de se tratar de gorduras e graxas, são solúveis nos solventes da borracha. A ação dos vapores de bromo nos pareceu outrossim, muito sugestiva, especialmente no que se refere aos glóbulos pequenos. Acreditamos que os maiores encerrem outros constituintes além da borracha. Também o resultado da extração de acôrdo com técnica de Bonner-Arreguin (1) nos pareceu muito conclusivo.

Verificamos que os glóbulos em aprêço são mais abundantes e maiores na fôlha adulta e no período estacional que abrange o fim do verão, o outono e o início do inverno. Estes fatos nos convenceram de que a formação desses glóbulos está intimamente relacionada a fenômenos de fotossíntese e crescimento. Allás, vários autores constataram que a produção de borracha nas fôlhas de outros vegetais, varia com as diversas condições de ambiente, desenvolvimento e idade da planta (3), (5), (8).

Em face do exposto, concluímos que:

1 — Os glóbulos existentes no mesofilo de *Rauwolfia grandiflora* Mart., comportam-se diante dos reagentes usados, como se entre as substâncias que os constituem, predominasse a borracha.

2 — A ocorrência desses glóbulos no mesofilo da planta, está ligado a fenômenos de metabolismo.

SUMMARY

Droplets were seen inside the mesophyll cells of *Rauwolfia grandiflora* Mart., which, according to their aspect and properties, are similar to those referred to by Whittenberger-Kelner (8) in the leaves of *Cryptostegia grandiflora* R. Br. and of a hybrid.

The small, round, droplets examined are stained by Sudan IV like other cell inclusions such as resins, fats, mucilages. However, they are insoluble in ethanol, sulphuric acid and chloral hydrate, and this excludes the possibility of they being composed of resins. Also they do not consist of mucilages because they are insoluble in boiling water, chloral hydrate, hypochlorite, and because they are soluble in ether.

The fact that they are insoluble in acetone does not invalidate the hypothesis of rubber being their main constituent, because that is a polar "non-solvent" for rubber which only swells globules.

The above mentioned hypothesis is reinforced by the peculiar effect of bromine vapors on the droplets, specially on the very small ones, and by their behaviour under the extraction procedures used.

It was possible to see that the droplets are larger and more abundant towards the end of summer, in fall and early winter, this suggesting that their elaboration is connected with seasonal activity. A correlation was found by several investigators, between rubber production in leaves and environment conditions, plant age and stage of development (3), (5), (8).

These observations lead to the following conclusions:

1 — The droplets detected in mesophyll cells of *Rauwolfia grandiflora* Mart. behave under the tests made as if their main constituent were rubber.

2 — The quantity of those droplets are related to seasonal metabolic activities.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado na Secção de Botânica Geral do Jardim Botânico, com o auxílio da bolsa "Emille Snethlage" que nos foi concedida pela Associação Brasileira de Mulheres Universitárias, a cuja Diretoria manifestamos os nossos agradecimentos.

Ao prezado mestre, Dr. FERNANDO ROMANO MILANEZ, a nossa profunda gratidão pelos valiosos ensinamentos e pelo incentivo amigo, que nos permitiram elaborar este trabalho.

Queremos consignar também os nossos agradecimentos ao Dr. WALTER B. MORS, do Instituto de Química, onde realizamos uma parte dos ensaios químicos, ao Sr. WALTER DOS SANTOS BARBOSA, Técnico de Laboratório do Jardim Botânico pelo auxílio prestado na confecção das fotografias e, enfim, a todas as pessoas que nos deram a sua colaboração.

BIBLIOGRAFIA

- 1) BONNER, J. e B. Arreguin — *Arch. of Biochem.* 21: 109-124. 1949.
- 2) CHEYNEY, L. E. — Methyl ethyl ketone extraction of rubber. *Ind. Eng. Chem.* 34: 1426-1428. 1942.



- 3) HALL, HARVEY MONROE e Thomas Harper Goodspeed — Chrysil, a new rubber of *Chrysothamnus nauseosus*, *Univ. of Calif. Pub. in Botany*. VII: 210-217. 1919.
- 4) KLEIN, G. — Handbuch der Pflanzenanalyse. II: 671. 1932. Viena.
- 5) POLHAMUS, L. G. — Rubber content of various species of goldenrod. *Journ. Agric. Research*. 47: 149-152. 1933.
- 6) SPENCE, D. e M. L. Caldwell — Determination of rubber in rubber bearing plants *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 5: 371-375. 1933. [Citado por Whittenberger-Kelner (8)].
- 7) STEVENS, W. C. — Plant anatomy. 350. London. 1924.
- 8) WHITTENBERGER, ROBERT T. e Albert Kelner — Rubber in *Cryptostegia chlorenchyma*. *Am. Journ. of Botany*. 32: 619-627. 1945.

EXPLICAÇÃO DAS FOTOGRAFIAS:

Foto n.º 1 — Corte transversal do bordo foliar de *Rauvolfia grandiflora* Mart., tratado pelo hipoclorito e sem coloração. Os glóbulos de borracha são postos em relevo pela iluminação oblíqua. Aumento: 190 X.

Foto n.º 2 — Corte transversal da fôlha de *Rauvolfia* tratado pelo hipoclorito, no qual se observam as células com risco conteúdo globular que aparece corado pelo Sudan IV. Material colhido durante o mês de março (outono). Aumento: 130 X.

Foto n.º 3 — Corte transversal da fôlha do mesmo vegetal, tratado pelo hipoclorito e corado pelo Sudan IV. Apenas pequenos glóbulos são visíveis no interior das células. Material colhido durante o mês de setembro (primavera). Aumento 130 X.

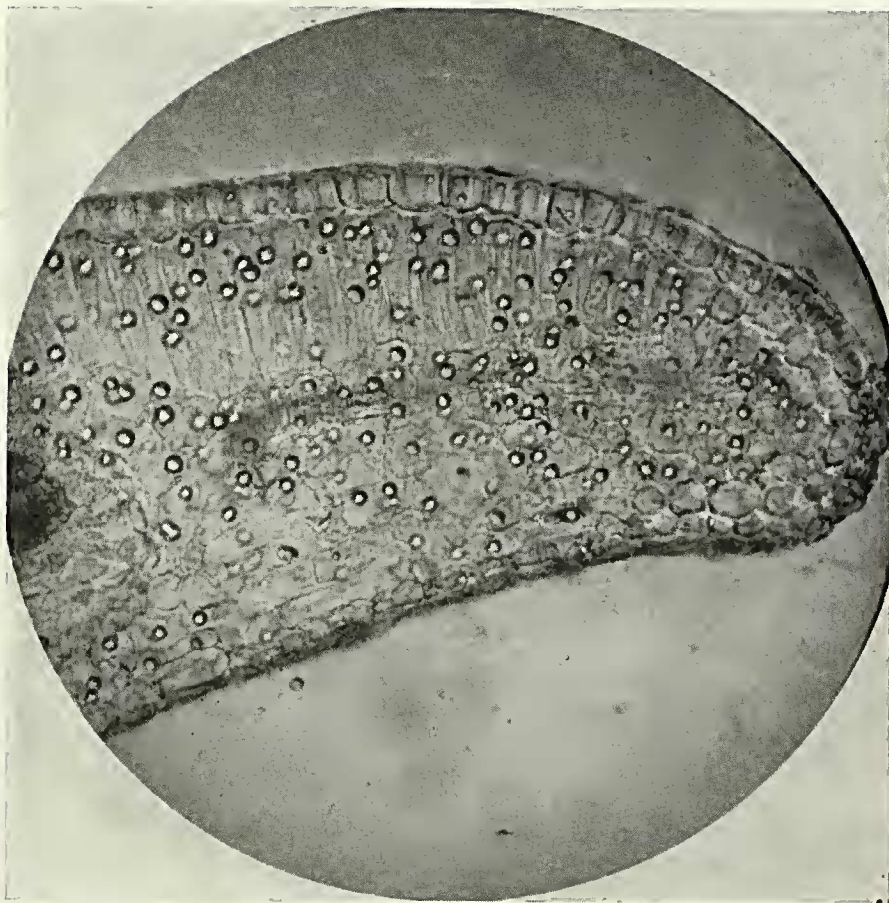


Foto 1

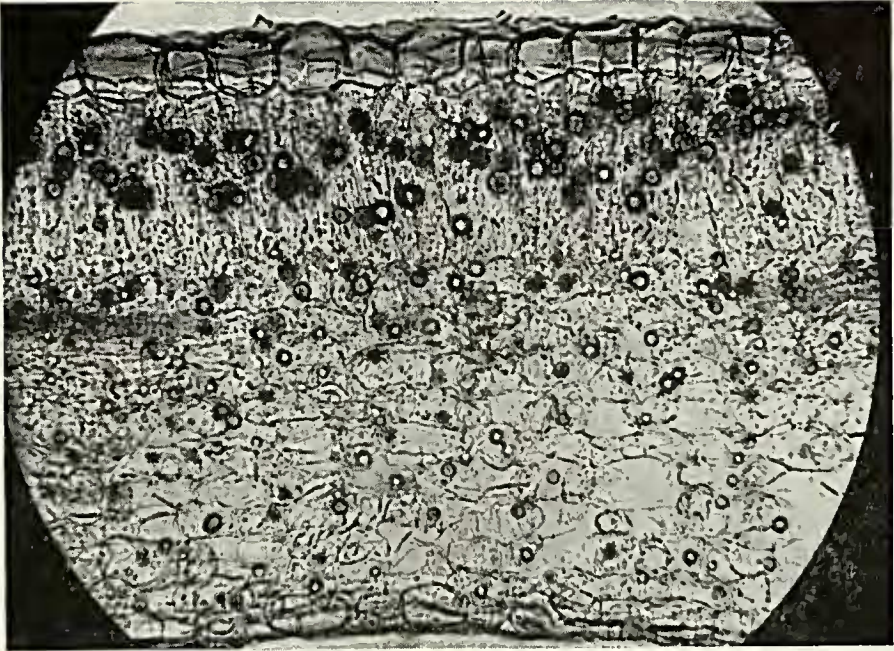


Foto 2

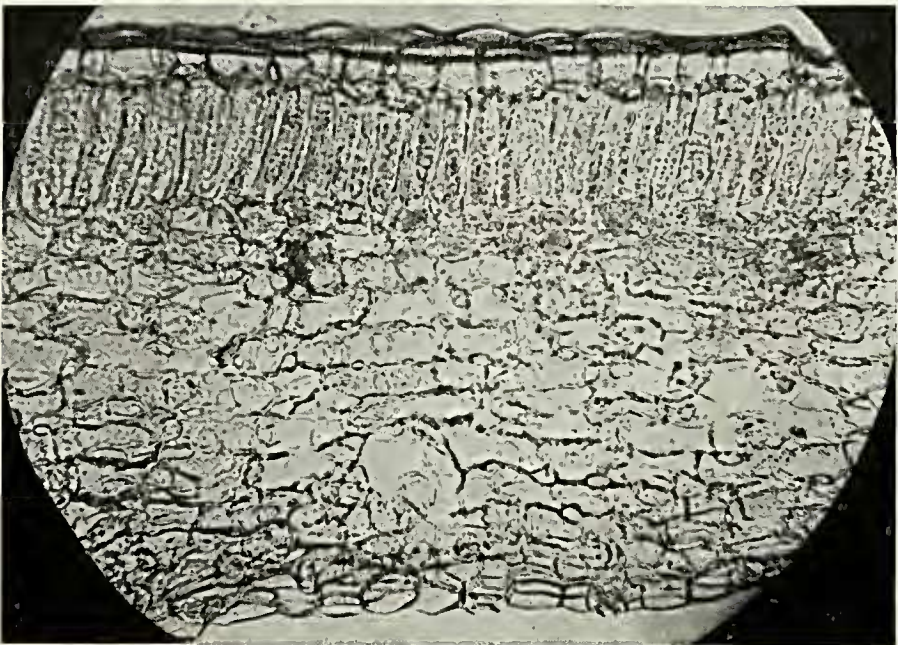


Foto 3